

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 6 月 2 4 日
Date of Application:

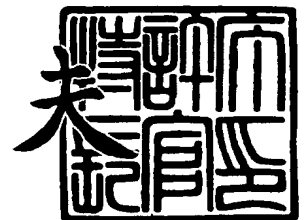
出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 1 8 3 2 4 9
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 1 8 3 2 4 9]

出 願 人 キヤノン株式会社
Applicant(s):

2 0 0 3 年 1 2 月 1 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康



【書類名】 特許願

【整理番号】 4663050

【提出日】 平成14年 6月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/10
G01N 33/50

【発明の名称】 含有量検定用標準プローブを持つDNAマイクロアレイ
及び検出用キット

【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 川口 正浩

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 含有量検定用標準プローブを持つDNAマイクロアレイ及び検出用キット

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 検体中に含まれる目的の塩基配列を有する核酸分子を検出するため使用される、該目的核酸分子の塩基配列に対して、相補的な塩基配列を持つ核酸プローブを基板上に固定化したDNAマイクロアレイにおいて、

前記検体中に含まれる前記目的の塩基配列を有する核酸分子の含有濃度を定量するため、

一種以上の該目的塩基配列を有する核酸の増幅反応検定用に添加される内部標準用プローブ、一種以上の検出操作及びプローブ量検定用に添加される外部標準用プローブからなる群から選ばれる一種以上のプローブを有することを特徴とするDNAマイクロアレイ。

【請求項 2】 基板上に固定化される該内部標準用プローブ及び/もしくは該外部標準用プローブは、

4 点以上の量もしくは密度で一連の群として基板上に固定化されていることを特徴とする請求項1に記載のDNAマイクロアレイ。

【請求項 3】 該内部標準用プローブは、内部標準核酸に由来する増幅反応産物の異なる鎖長に対応する、二種以上のプローブで構成されることを特徴とする請求項1又は 2 に記載のDNAマイクロアレイ。

【請求項 4】 該外部標準用プローブは、添加される外部標準核酸に対して、任意の核酸塩基数の非相補的な塩基配列を含む二種以上のプローブで構成されていることを特徴とする請求項1又は 2 に記載のDNAマイクロアレイ。

【請求項 5】 該内部標準用プローブおよび外部標準用プローブは、合成核酸を基板上に固定化したものであることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のDNAマイクロアレイ。

【請求項 6】 該合成核酸の鎖長は、15塩基～75塩基の長さであることを特徴とする請求項5に記載のDNAマイクロアレイ。

【請求項 7】 DNAマイクロアレイを利用して、目的の塩基配列を有する核酸を定量的に検出する際、該目的の塩基配列を有する核酸の増幅反応時に、該目的の塩基配列を有する核酸と同時に増幅に供される内部標準核酸の増幅反应用プライマーセットであって、
目的の塩基配列を有する核酸に由来する増幅産物の鎖長と、該プライマーセットが与える内部標準核酸に由来する増幅産物の鎖長とが同等になるように設計されていることを特徴とするプライマーセット。

【請求項 8】 DNAマイクロアレイを利用して、目的の塩基配列を有する核酸を定量的に検出する際、該目的の塩基配列を有する核酸の増幅反応時に、該目的の塩基配列を有する核酸と同時に増幅に供される内部標準核酸の増幅反应用プライマーセットを含む検出用キットであって、
前記目的の塩基配列を有する核酸に由来する増幅産物の鎖長が二種以上ある際、該異なる鎖長に対応する請求項 7 に記載のプライマーセットを二種以上包含することを特徴とする目的塩基配列検出用キット。

【請求項 9】 該プライマーセット複数が、増幅産物鎖長 200bp 以下用、200～500bp 用、500～2000bp 用、2000bp 以上用として、各 1 種以上包含されていることを特徴とする請求項 8 に記載の目的塩基配列検出用キット。

【請求項 10】 DNAマイクロアレイを利用して、目的の塩基配列を有する核酸を定量的に検出する際、検体に添加される外部標準核酸を含む検出用キットであって、
検出可能な標識物で標識された合成核酸である外部標準核酸を二種以上包含することを特徴とする目的塩基配列検出用キット。

【請求項 11】 該標識物が、蛍光物質、放射性物質、発光物質のいずれかであることを特徴とする請求項 9 に記載の目的塩基配列検出用キット。

【請求項 12】 DNAマイクロアレイを利用して、目的の塩基配列を有する核酸を定量的に検出する際、該目的の塩基配列を有する核酸の増幅反応時に、該目的の塩基配列を有する核酸と同時に増幅に供される内部標準核酸を含む検出用キットであって、
検出目的の塩基配列と相同性を持たない、微生物由来核酸もしくは、ウイルス由

来核酸を内部標準核酸として二種以上包含することを特徴とする目的塩基配列検出キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、検体中に含まれる目的の塩基配列を有する核酸量の定量分析に有用なDNAマイクロアレイに関する。より具体的には、検体中に含まれる目的の塩基配列を有する核酸に対して、相補的な塩基配列を持つ核酸プローブを固相上に固定化してなるDNAマイクロアレイを用いて、定量的分析を行う際、定量精度向上を可能とするDNAマイクロアレイ、ならびに、該DNAマイクロアレイによる検出操作に利用する検出用キットに関する。

【0002】

【従来の技術】

ハイブリダイゼーション法に基づく、遺伝子DNAの検出、測定法の発展として、基板上に複数種の核酸プローブを固定し、検体試料中に含有される遺伝子DNAに対して、同時に複数の検出試験を行う用途を有する、遺伝子チップ（DNAチップ、マイクロアレイ）に関する研究が近年急速に進んでいる。かかる遺伝子チップ（DNAチップ、マイクロアレイ）を利用する検体試料中に含有される遺伝子DNAの検出、測定法は、分子生物学研究、遺伝子疾患、感染症診断など様々な分野での応用が期待されている。

【0003】

遺伝子チップの基本形態は、ハイブリダイゼーション法に基づき、目的とする遺伝子DNAを検出するため、目的遺伝子の塩基配列に対して、相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片複数種を、ガラスなどの基板表面にアレイ状に固定化したものである。目的遺伝子に対して、ハイブリダイゼーション・プローブとして利用される、相補的な塩基配列を持つ一本鎖核酸断片は、オリゴDNAと呼ばれる、化学合成されたDNAオリゴマーや、cDNAと呼ばれる、生物組織由来の遺伝子を鋳型として、酵素的に生合成された相補鎖DNA断片などが、一般的に利用される。一本鎖核酸断片の基板表面への固定化に関しては、オリゴDNA

では、例えば、US 5, 474, 796（または、特表平9-500568号公報、出願人：ProtoGene Laboratories）に記載される方法のように、予め末端を固定した上で、DNA分子自体を基板上で逐次合成し、固定化された核酸断片とする方法と、例えば、特開平11-187900号公報（出願人：キヤノン株式会社）に記載される方法のように、オリゴDNAを別途合成した後、種々の結合手段を利用して、核酸断片を基板上に固定化する方法とに大別される。

【0004】

別途調製した核酸断片を、基板上へ固定化する手段として、様々な方式、例えば、基板の持つ電荷と核酸断片の電荷を利用した吸着固定法、また、ポリーL-リジン、アミノシランカップリング剤などを基板表面にコートし、このコート被膜を利用して固定効率の向上を図った固定法などが提案されている。

【0005】

現在、一般に使用されているDNAマイクロアレイは、目的の塩基配列を有する核酸の定量分析のための特別なプローブ等は搭載されていない。従来、固相表面での逐次合成法で作製されたDNAマイクロアレイであっても、ピン法で作製されたDNAマイクロアレイであっても、その作製方法に起因するバラツキ、例えば、核酸配列による合成効率のバラツキ、ピン・スポッターから基板に滴下されるプローブ液量のバラツキや、固定率のバラツキなどを内包するため、定量精度、再現性に問題があった。一方、これらDNAマイクロアレイ作製時のバラツキを解決するべく、インクジェットを用いた作製法（特開平11-187900号公報）などが提案されている。

【0006】

一方、DNAマイクロアレイによる遺伝子検査に供される検体に対しては、感度の問題から、一般に、目的の塩基配列を有する核酸の増幅操作を施し、同時に検出可能な標識物を取り込ませた増幅産物を得る。この増幅操作の基本技術は、PCRと呼ばれ、米国特許第4683195、第4683202、第4965188などに記載されている。しかしながら、PCRは、その増幅反応の過程に制御の困難な要因を多数含み、例えば、同一のサンプルを同時に増幅した場合でも、増幅産物の収率は数倍から数十倍の間でバラツキを生じることもあることが知ら

れている。この増幅産物収量の不確定性を解決すべく、多くの研究が行われ、競合 (Competitive) PCR法などが発明された。競合PCR法は、P. D. Siebertらの論文 (Nature 359 ; 557-558 (1992) , Bio Techniques 14 ; 244-249 (1993)) などに詳しい。また、別の方法としては、患者等から採取された検体に、既知量の内部標準となる核酸を添加し、目的の塩基配列を有する核酸の増幅反応と同時に内部標準核酸も増幅して、この内部標準核酸の増幅率から目的の塩基配列の有する核酸の増幅率を推定する手法などが挙げられる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

上で述べたように、DNAマイクロアレイを用いて、目的の塩基配列を有する核酸の定量分析を行う上では、その定量性に影響を及ぼす、様々な不安定要因が存在している。

【0008】

まず、DNAマイクロアレイ作製時、基板上に固定化されるプローブ量のバラツキに由来する精度、再現性の低信頼性がある。また、PCR法における、目的の塩基配列を有する核酸の増幅効率の不確定性に起因し、検体に含まれる目的の塩基配列を有する核酸の増幅率にバラツキがある。従来、これら異なる要因のバラツキは、別途、様々な方法でそれぞれを検定した後、DNAマイクロアレイを用いた定量分析に供され、分析結果を、それぞれの検定結果に基づく補正を行って、実際の定量を得ていた。

【0009】

これら複数種の検定作業は、何れも、非常に煩雑であり、また、長時間の作業が必要であることから、多数の検体を処理する上で、検定作業がその作業性を阻害する要因となっていた。

【0010】

本発明は前記の課題を解決するもので、本発明の目的は、これらの検定作業を著しく簡便化し、検体中に含まれる目的の塩基配列を有する核酸の定量、測定時に、その補正データを取得することが可能なDNAマイクロアレイと、その際に利用する検定用キットを提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、前記課題を解決すべく、鋭意検討を進めたところ、DNAマイクロアレイを作製する際、プローブの固定法として、インクジェットを利用して、別途作製した核酸プローブを基板上に塗布・固定する作製法（特開平11-187900号公報）を採用し、目的の塩基配列を有する核酸の検出用核酸プローブに加えて、同一のDNAマイクロアレイ上に内部標準用プローブおよび／または外部標準用プローブを併せて、同じ手法で固定しているDNAマイクロアレイとすることで、これらの検定作業を著しく簡便化できることを見出した。かかる知見に基づき、本発明者らは、前記のDNAマイクロアレイを用いる検出操作において、これらの検定作業を精度良く、簡便に運用するためのキットをも考案し、本発明を完成するに至った。

【0012】

すなわち、本発明にかかるDNAマイクロアレイは、

検体中に含まれる目的の塩基配列を有する核酸分子を検出するため使用される、該目的核酸分子の塩基配列に対して、相補的な塩基配列を持つ核酸プローブを基板上に固定化したDNAマイクロアレイにおいて、

前記検体中に含まれる前記目的の塩基配列を有する核酸分子の含有濃度を定量するため、

一種以上の該目的塩基配列を有する核酸の増幅反応検定用に添加される内部標準用プローブ、一種以上の検出操作及びプローブ量検定用に添加される外部標準用プローブからなる群から選ばれる一種以上のプローブを有することを特徴とするDNAマイクロアレイである。その際、基板上に固定化される該内部標準用プローブ及び／もしくは該外部標準用プローブは、

4点以上の量もしくは密度で一連の群として基板上に固定化されていることが好ましい。

【0013】

なお、DNAマイクロアレイ上に固定化される、該内部標準用プローブは、内部標準核酸に由来する増幅反応産物の異なる鎖長に対応する、二種以上のプローブ

で構成されることが望ましい。また、該外部標準用プローブは、添加される外部標準核酸に対して、任意の核酸塩基数の非相補的な塩基配列を含む二種以上のプローブで構成されていることが望ましい。

【0014】

加えて、該内部標準用プローブおよび部標準用プローブは、合成核酸を基板上に固定化したものであることがより好ましい。その際、該合成核酸の鎖長は、15塩基～75塩基の長さであることが好ましい。

【0015】

さらには、本発明にかかるDNAマイクロアレイが、内部標準用プローブを具えるものである際、目的の塩基配列を有する核酸の増幅反応時に、該目的の塩基配列を有する核酸と同時に、内部標準核酸を増幅に供し、増幅反応の増幅効率を測定するが、この内部標準核酸の増幅反应用プライマーセットの発明も本発明は提供する。すなわち、本発明にかかるプライマーセットは、

目的の塩基配列を有する核酸の増幅反応時に、該目的の塩基配列を有する核酸と同時に増幅に供される内部標準核酸の増幅反应用プライマーセットであって、目的の塩基配列を有する核酸に由来する増幅産物の鎖長と、該プライマーセットが与える内部標準核酸に由来する増幅産物の鎖長とが同等になるように設計されていることを特徴とするプライマーセットである。

【0016】

また、本発明は、前記の内部標準核酸の増幅反应用プライマーセットを含め、本発明のDNAマイクロアレイを利用して、目的の塩基配列を有する核酸を定量的に検出する用途に適合する検出用キットをも併せて提供する。すなわち、本発明にかかる目的塩基配列検出用キットは、

DNAマイクロアレイを利用して、目的の塩基配列を有する核酸を定量的に検出する際、該目的の塩基配列を有する核酸の増幅反応時に、該目的の塩基配列を有する核酸と同時に増幅に供される内部標準核酸の増幅反应用プライマーセットを含む検出用キットであって、

前記目的の塩基配列を有する核酸に由来する増幅産物の鎖長が二種以上ある際、該異なる鎖長に対応する請求項7に記載のプライマーセットを二種以上包含する

ことを特徴とする目的塩基配列検出用キットである。その際、例えば、該プライマーセット複数が、増幅産物鎖長200bp以下用、200～500bp用、500～2000bp用、2000bp以上用として、各1種以上包含されていることを特徴とする目的塩基配列検出用キットとすることができる。

【0017】

一方、本発明にかかる目的塩基配列検出用キットでは、

DNAマイクロアレイを利用して、目的の塩基配列を有する核酸を定量的に検出する際、該目的の塩基配列を有する核酸の増幅反応時に、該目的の塩基配列を有する核酸と同時に増幅に供される内部標準核酸を含む検出用キットであって、検出目的の塩基配列と相同性を持たない、微生物由来核酸もしくは、ウイルス由来核酸を内部標準核酸として二種以上包含することを特徴とする目的塩基配列検出キットとすることが望ましい。

【0018】

また、本発明にかかるDNAマイクロアレイが、外部標準用プローブを具えるものである際、本発明は、前記の外部標準核酸を含め、本発明のDNAマイクロアレイを利用して、目的の塩基配列を有する核酸を定量的に検出する用途に適合する検出用キットをも併せて提供する。すなわち、本発明にかかる目的塩基配列検出用キットは、

DNAマイクロアレイを利用して、目的の塩基配列を有する核酸を定量的に検出する際、検体に添加される外部標準核酸を含む検出用キットであって、検出可能な標識物で標識された合成核酸である外部標準核酸を二種以上包含することを特徴とする目的塩基配列検出用キットである。なお、その際、該標識物が、蛍光物質、放射性物質、発光物質のいずれかであることが好ましい。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明にかかる第一の形態は、内部標準用プローブをDNAマイクロアレイ上に搭載することである。

【0020】

内部標準用プローブとは、広義としては、目的の塩基配列を有する核酸の定量

を補助するために利用する内部標準核酸を検出するためのプローブである。検体中において存在量が判明している、内部標準核酸（遺伝子）と相補的な塩基配列を有し、内部標準核酸（遺伝子）と結合しうる核酸プローブであって、内部標準核酸の存在量と、目的の塩基配列を有する核酸の存在量との相対比を測定することで、目的の塩基配列を有する核酸の存在量の定量を可能とするものを指す。例えば、生体細胞で細胞骨格を形作る遺伝子（ハウスキーピング遺伝子）産物は、その発現量に変動が少なく、発現量も比較的多いので内部標準核酸として用いられることが多い。具体的には、GAPDH、 β -アクチン、リボゾーマルRNAなどが挙げられる。

【0021】

さらに、狭義の内部標準核酸は、PCRに代表される核酸の増幅反応を利用して、核酸量の増倍や、目的とする塩基配列を有する核酸に検出可能な標識物を付加するため、増幅反応を行う際に、検体中に添加する、既知の塩基配列を有し、既知量の添加を行う核酸を指す。検体中に添加された既知の塩基配列、既知量の核酸（内部標準核酸）は、目的の塩基配列を有する核酸に対する増幅反応もしくは標識反応と同時に、目的の塩基配列を有する核酸と同じ効率で増幅もしくは標識されるように条件を設定する。増幅反応もしくは標識反応の後、この添加された内部標準核酸の量を定量することで、増幅倍率や標識付加率を算定する上で利用でき、また、目的の塩基配列を有する核酸の存在量を、内部標準核酸の存在量に対する相対比として求めることが可能なものを指す。

【0022】

本発明にかかる第二の形態は、外部標準用プローブをDNAマイクロアレイ上に搭載することである。

【0023】

外部標準核酸とは、主として、DNAマイクロアレイの作製工程及び/または検出、測定工程でのバラツキなどを補正する目的で、検体中に添加される既知の塩基配列を有する核酸を指す。具体的には、合成DNA、プラスミッドDNAなどの純度の高い核酸に、検出、定量可能な標識物を導入したものを使用する。また、かかる外部標準核酸に付されている標識に関して、その標識効率などを事前に検定した

ものである。この外部標準核酸は、DNAマイクロアレイの種類（対象遺伝子）に依らず、検出目的の塩基配列とは相同性を示さない塩基配列を有するものであれば、全てのDNAマイクロアレイに同じものを使用できる。外部標準用プローブは、前記の外部標準核酸に対して、相補的な塩基配列を有し、選択的に結合可能な核酸プローブである。

【0024】

また、外部標準核酸、外部標準用プローブは、数種類のセットを同時に用いることで、DNAマイクロアレイの有する性能、すなわち、定量性の検定が可能となる。具体的には、例えば、3種類以上、好ましくは、5種類以上の外部標準用プローブを搭載したDNAマイクロアレイを用意し、これに対応した標識済み外部標準核酸を、目的の塩基配列を有する核酸の検出操作にそれぞれの種類ごとに濃度（既知量）を変えて添加する。これらの外部標準核酸の検出量をプロットすることで、検量線を作成することが可能となる。また、一種類の外部標準核酸と外部標準用プローブのセットを用いて、DNAマイクロアレイに固定されているプローブ量を検定することも可能である。つまり、一種類のセットを用いて、DNAマイクロアレイ間（基板間）において、プローブ固定効率のバラツキを補正することも可能である。この方法は、まず、外部標準用プローブを3種以上、好ましくは、5種以上の別濃度でDNAマイクロアレイ上に固定化し、搭載する。これに、十分量の標識済み外部標準核酸を反応させて、結合した外部標準核酸の量を測定することで、DNAマイクロアレイ上に実際に固定されているプローブの分子数比が測定できる。

【0025】

本発明にかかる第三の形態は、上記する第一及び第二の形態のDNAマイクロアレイを利用する検出、定量法を、より有効かつ簡便に活用するために用いられる検出用キットである。

【0026】

この検出用キットには、内部標準用プローブを具えるDNAマイクロアレイを利用する際には、まず、内部標準核酸の増幅用プライマーセットが包含される。また、外部標準用プローブを具えるDNAマイクロアレイを利用する際には、検出、

定量可能な標識物で標識され、その標識率が検定された外部標準核酸が包含される。これらは、いずれも内部標準用プローブ、外部標準用プローブに対応させて、少なくとも、一種類、必要に応じて、数種類～十数種類がセットとして、検定用キットに組み込まれる。

【0027】

内部標準核酸の増幅用プライマーセットは、様々な要件によってその内容は変化する。まず、内部標準核酸を鋳型とする増幅反応において、内部標準用プローブと相補的な塩基配列を有する増幅産物を生じるように、プライマーセットの塩基配列（対応位置）が設定されていなくてはならない。また、同時に、目的の塩基配列を有する核酸を増幅する際に、目的の塩基配列を有する核酸を鋳型として、意図しない増幅産物を生じないように留意する必要もある。さらに、内部標準として、定量性の精度を向上させるためには、目的の塩基配列を有する核酸の増幅反応で生じる増幅産物の核酸鎖長と、内部標準核酸を本キットに含まれる増幅用プライマーを用いて増幅した際に得られる増幅産物の核酸鎖長とが、著しく異なることを避けるべきである。具体的には、内部標準核酸に由来する増幅産物の核酸鎖長を数種類のレンジに設定し、目的の塩基配列を有する核酸に由来する増幅産物の鎖長と、内部標準核酸に由来する増幅産物の鎖長のいずれかが同等となるように選択することが望ましい。例えば、得られる増幅産物の鎖長が、200bp以下用、200～500bp用、500～2000bp用、2000bp以上用の4種類となる、四種のプライマーセットを用意し、目的の塩基配列を有する核酸に由来する増幅産物の鎖長に合わせて、適合するものを選択することが望ましい。もちろん、この増幅産物鎖長のレンジ設定をさらに細分化して、多数のプライマーセットを用意することは何ら問題ない。

【0028】

内部標準核酸に利用される核酸は、既知の塩基配列を有し、かつ高い純度のものを入手できるものが好適に利用でき、例えば、分子生物、医療分野で一般に市販されている核酸、例えば、プラスミッドベクター、ファージDNA、微生物ゲノムなどを利用することができる。特に、プラスミッドベクター、ファージDNA等は、純度の高い、単一種の試料を比較的簡便に入手できることから、より好適に

用いられる。

【0029】

一方、検出、定量可能な標識物で標識され、その標識率が検定された外部標準核酸も、既知の塩基配列を有し、かつ高い純度のものを入手できるものが好適に利用でき、例えば、合成DNA、プラスミッドベクターなどがより好適に用いられる。合成DNAは、安定した標識効率であり、また、分子量当たりの標識率の高いものが得られることから特に好適に用いられる。

【0030】

加えて、本発明にかかるDNAマイクロアレイでは、内部標準用プローブと外部標準用プローブとの双方を具える形態とすることがより好ましい。それに伴い、検定用キットは、内部標準核酸の増幅用プライマーセットと、外部標準核酸とを双方ともに具えたキットとすることが好ましい。

【0031】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ここに挙げる実施例は、本発明にかかる最良の実施形態の一例ではあるものの、本発明は、かかる実施例に示す形態に限定されるものではない。

【0032】

(実施例1) 内部標準用核酸の調製

内部標準用核酸として、既知の塩基配列を有するプラスミッドDNA: pUC118 (3,162 bp、宝酒造株式会社製) を選択した。PCRのテンプレートとする必要から、定法に従って、前記プラスミッドpUC118を、制限酵素EcoRIで切断し、直鎖DNAとした。次に、アガロースゲル電気泳動で切断状況を確認した後、制限酵素切断反応液をフェノール処理し、エタノール沈澱により、目的の直鎖DNAを回収した。回収した直鎖DNAを、TE緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH. 7.5)、1mM EDTA) 中に、最終濃度10ng/μl (2.4 pmol/ml) となるように溶解し、内部標準用核酸溶液とした。

【0033】

(実施例 2) 内部標準用核酸の増幅用プライマーの調製

実施例 1 で調製した、直鎖状 DNA : pUC118 EcoR I Digest の塩基配列情報に基づき、PCR 用プライマーとして、下記表 1 に示す、順方向プライマー 5 種 : P1 ~ P5、逆方向プライマー 4 種 : RP1 ~ RP4 を選択した。

【0034】

【表 1】

表 1

名称	配列	鎖長	ポジション	GC(%)
F-Primer	P1 gagacaataaccctgata	18	1083 - 1100	38.9
	P2 ccttaacgtgagttttcg	18	2101 - 2118	44.4
	P3 gcttgagcgaacgacct	18	2507 - 2524	61.1
	P4 gagtcgacctgcaggcat	18	32 - 49	61.1
	P5 ggttggactcaagacgatag	20	2432 - 2451	50.0
R-Primer	RP1 taagttgggtaacgccag	18	116 - 99	50.0
	RP2 agggcgctggcaagtgtta	18	368 - 351	61.2
	RP3 cgttttcggtgatgacggt	18	926 - 909	55.6
	RP4 gcggtaatacggttatccac	20	2858 - 2839	50.0

【0035】

表 1 中に示されるポジションは、制限酵素 EcoR I の認識部位の先頭をポジション 1 として、ナンバリングしなおした際、当該プライマーの塩基配列の位置を示す。なお、表 1 中の逆方向プライマー ; RP1 ~ RP4 に関しては、相補鎖上における塩基配列の位置を示す。

【0036】

表 1 に塩基配列を示す各プライマーは、合成後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製し、それぞれ、最終濃度 $10 \text{ pmol} / \mu\text{l}$ となるように TE 緩衝液に溶解し、プライマー溶液とした。

【0037】

図 1 に、実施例 1 で調製される、内部標準用核酸 : pUC118 EcoR I Digest を鋳型として、表 1 に示すプライマーを用いて、PCR 増幅反応を行った際に取得される増幅産物の鎖長、ならびに、利用される順方向プライマーと逆方向プライマー

との組み合わせを示す。なお、逆方向プライマーには、5' 末端に蛍光標識（ローダミン）を行ったものを別途に用意し、上記未標識のプライマーと同様の処理を行って蛍光標識プライマー溶液とした。

【0038】

（実施例 3）内部標準用プローブの調製

実施例 1 で調製される、直鎖状 DNA : pUC118 EcoR I Digest の塩基配列情報に基づき、直鎖状プラスミッド : pUC118 EcoR I Digest の配列情報より以下の内部標準用プローブを設定した。

【0039】

【表 2】

表 2

名称		配列	鎖長	ポジション	GC(%)
Probe	B-SH	actggccgctcgttttaca	18	61 - 78	50.0
	D-SH	gtgagctatgagaaagcgcc	20	2549 - 2568	55.0
	F-SH	ggtatctttatagtcctgtc	20	2663 - 2682	40.0
	H-SH	ggccttttgctcacatgttc	20	2795 - 2814	50.0

【0040】

表 2 中に示されるポジションは、制限酵素 EcoR I の認識部位の先頭をポジション 1 として、ナンバリングしなおした際、当該プローブの塩基配列の位置を示す。

【0041】

表 2 に塩基配列を示す内部標準用プローブ 4 種は、それぞれ、DNA マイクロアレイ上に固定するための官能基として、合成後、定法に従って、各核酸の 5' 末端にスルファニル基を導入した。官能基の導入後、精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥した内部標準用プローブは、冷凍庫中、-30℃で保存した。

【0042】

図 1 に、内部標準用プローブ 4 種がハイブリダイズする、標的塩基配列の位置を示す。また、各 PCR 増幅産物についても、併せて、標的塩基配列の位置を示す。

【0043】

(実施例 4) 外部標準核酸の調製

実施例 1 で準備した直鎖状プラスミッド：pUC118 EcoR I Digest の配列情報より以下の外部標準核酸を設定した。

【0044】

【表 3】

表 3

名称		配列	鎖長	ポジション	GC(%)
Target	A-Rho	tgtaaaacgacggccagt	18	78 - 61	50.0
	C-Rho	ggcgctttctcatagctcac	20	2568 - 2549	55.0
	E-Rho	gacaggactataaagataacc	20	2682 - 2663	40.0
	G-Rho	gaacatgtgagcaaaaggcc	20	2814 - 2795	50.0

【0045】

表 3 中に示されるポジションは、制限酵素EcoR Iの認識部位の先頭をポジション1として、ナンバリングしなおした際、当該外部標準核酸の塩基配列の位置を示す。この外部標準核酸 4 種は、表 2 に示す内部標準用プローブ 4 種に対して、相補的な塩基配列を有する。

【0046】

表 3 に塩基配列を示す外部標準核酸 4 種は、それぞれ、検出、定量用の標識として、合成後、定法に従って、各核酸の 5' 末端に蛍光色素（ローダミン）を導入した。蛍光標識の導入後、精製し、最終濃度 5 μ M になるように TE 緩衝液に溶解し、外部標準核酸溶液とした。この外部標準核酸溶液は、遮光処理を施した容器に入れた上で、冷凍庫中、-30℃で保存した。

【0047】

図1に、外部標準核酸 4 種に関しても、それと相補的な塩基配列を有する、上記内部標準用プローブ 4 種がハイブリダイズする、標的塩基配列の位置と併せて、その塩基配列の位置を示す。

【0048】

(実施例 5) DNA マイクロアレイの作製

[1] ガラス基板の洗浄

合成石英ガラス基板（サイズ：25mm×75mm×1mm、飯山特殊ガラス社製）を、

耐熱性、耐アルカリ性のラックに入れ、所定の濃度に調製した超音波洗浄用の洗浄液に浸した。一晚洗浄液中で浸した後、20分間超音波洗浄を行った。続いて、洗浄液から基板を取り出し、軽く純水ですすいだ後、超純水中で20分超音波洗浄を行った。次に、80℃に加熱した1N水酸化ナトリウム水溶液中に、10分間基板を浸した。再び、純水洗浄と超純水洗浄を行い、DNAチップ用の洗浄済石英ガラス基板を用意した。

【0049】

[2] 表面処理

シランカップリング剤；KBM-603（信越シリコン社製）を、濃度1wt%となるように、純水中に溶解させ、2時間室温で攪拌した。続いて、洗浄済ガラス基板をシランカップリング剤水溶液に浸し、20分間室温で放置した。ガラス基板を引き上げ、軽く純水で基板表面を洗浄した後、基板の両面に窒素ガスを吹き付けて乾燥させた。次に、乾燥した基板を120℃に加熱したオーブン中で1時間バークし、表面のカップリング剤処理を完結させた。このアミノシランカップリング剤処理に伴い、基板表面にアミノ基が導入される。

【0050】

一方、同仁化学研究所社製のN-マレイミドカプロイロキシスクシイミド（N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimido、以下、EMCSと略す）を、ジメチルスルホキシドとエタノールの1:1（体積比）混合溶媒中に最終濃度が0.3mg/mlとなるように溶解したEMCS溶液を用意した。バークの終了後、ガラス基板を放冷し、次いで、調製したEMCS溶液中に室温で2時間浸した。この処理により、シランカップリング剤処理によって表面に導入されたアミノ基と、EMCSのスクシイミド基とが反応し、基板表面にEMCSに由来するマレイミド基が導入される。EMCS溶液から引き上げたガラス基板を、先述のジメチルスルホキシドとエタノールの混合溶媒を用いて洗浄する。さらに、エタノールにより洗浄した後、表面処理を施したガラス基板を窒素ガス雰囲気下で乾燥させた。

【0051】

[3] プローブDNA

実施例 3 で調製した内部標準用プローブ 4 種を利用し、下記表 4 に示す組成表に従って、純水に溶解し、種々の濃度を有する溶液の調製、混合溶液の調製を行った。各内部標準用プローブ溶液は、調製後一定量毎に小分けし、凍結乾燥を行い、水分を除いた。

【0052】

【表 4】

表 4

No.	内容		濃度
1	B-SH	1 色	1.5OD/ml
2	D-SH		
3	F-SH		
4	H-SH		
5	B-SH	1 色	0.75OD/ml
6	D-SH		
7	F-SH		
8	H-SH		
9	B-SH	1 色	0.5OD/ml
10	D-SH		
11	F-SH		
12	H-SH		
13	B-SH	1 色	0.375OD/ml
14	D-SH		
15	F-SH		
16	H-SH		
17	B+D	2 色混合	0.75OD/ml each
18	B+F		
19	B+H		
20	D+F		
21	D+H		
22	F+H		
23	B+D+F	3 色混合	0.5OD/ml each
24	B+D+H		
25	B+F+H		
26	D+F+H		
27	B+D+F+H	4 色混合	0.375OD/ml each

【0053】

[4] BJ プリンターによる DNA 吐出、および基板への結合

グリセリン 7.5 wt %、チオジグリコール 7.5 wt %、尿素 7.5 wt %、アセチレノール EH（川研ファインケミカル社製） 1.0 wt %を含む水溶液を用意した。続いて、表 4 に示す、予め小分け調製した 27 種類のプローブ溶液凍結乾燥物を、上記の混合溶媒所定量に加え、規定濃度なるように溶解した。得られた DNA プローブ溶液を、バブルジェット・プリンター（商品名：BJF-850 キヤノン社製）用インクタンクに充填し、印字ヘッドに装着した。

【0054】

なお、ここで使用するバブルジェット・プリンターは、平板への印刷が可能なように改造を施したものである。また、このバブルジェット・プリンターは、所定のファイル作成方法に従って印字パターンを入力することにより、対応するパターンにインクドットの吐出を行い、約 5 ピコリットルの DNA 溶液を約 120 マイクロメートルピッチでスポッティングすることが可能となっている。

【0055】

続いて、この改造バブルジェット・プリンターを用いて、1 枚の表面処理済ガラス基板に対して、図 2 に示す配列順序に従って、27 種類のプローブ溶液をそれぞれ、スポッティングした。目的とするスポット印字が行われていることを確認した後、30 分間加湿チャンバー内に静置して、ガラス基板表面のマレイミド基と DNA プローブ 5' 末端のスルファニル基とを反応させた。

【0056】

[5] 洗浄

30 分間の反応後、100 mM の NaCl を含む 10 mM のリン酸緩衝液（pH 7.0）により表面に残った DNA 溶液を洗い流し、ガラス基板表面にマトリックス状にスポットされた一本鎖 DNA が固定した遺伝子チップ（DNA プローブ・アレイ基板）を得た。

【0057】

（実施例 6）外部標準核酸による基板の検定

実施例 5 で作製した DNA マイクロアレイを 8 枚用意した。この 8 枚の DNA マイクロアレイに対して、以下に示す組成のブロッキング溶液に浸し、室温で 3 時間放置し、ブロッキング処理を施した。

【 0 0 5 8 】

【表 5】

ブロッキング溶液組成

成分	含有濃度
牛血清アルブミン (Sigma 社製)	2 % (w / v)
N a C l	1 0 0 m M
リン酸緩衝液 p H 7 . 0	1 0 m M

【 0 0 5 9 】

一方、下記表 6 に示す組成の外部標準核酸を含んだハイブリダイゼーション溶液を 8 種類作製した。なお、ハイブリダイゼーション溶液の基本溶媒は、1 0 0 m M N a C l、1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 0) (以下、基本緩衝液と称す。)であり、表 6 に示す外部標準核酸の単独または混合物を、この基本緩衝液に、それぞれ、合計の最終核酸濃度として 3 0 n M になるように溶解した。

【 0 0 6 0 】

【表 6】

表 6

No.	外部標準核酸	含有濃度
1	A	30nM each
2	G	30nM each
3	A+G	15nM each
4	C+G	15nM each
5	E+G	15nM each
6	A+C+G	10nM each
7	C+E+G	10nM each
8	A+C+E+G	7.5nM each

【 0 0 6 1 】

表 6 中、外部標準核酸の欄に記入した略号は、表 3 に示した外部標準核酸名称の頭文字であり、その外部標準核酸が含有されることを示す。

【 0 0 6 2 】

ブロッキング処理終了後、DNA マイクロアレイを基本緩衝液でリンスした。
用意した 8 種類のハイブリダイゼーション溶液に、ブロッキング処理済みの DNA マ

マイクロアレイを各1枚浸し、ビニールパックで密閉した。それぞれ、45℃で3時間、ハイブリダイゼーション反応を行わせた。

【0063】

反応終了後、DNAマイクロアレイをビニールパックから取り出し、以下の洗浄を行った。

2×SSC+0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 55℃ 5分×3回
0.1×SSC 室温 1分×1回

なお、2×SSCの組成は、NaCl 17.5g/l、クエン酸三ナトリウム・2水和物 8.8g/lであり、水酸化ナトリウム溶液を用いてpH 7.0に調整したものである。

【0064】

洗浄終了後、エアブローを用いて液切りを行い、乾燥させた。乾燥後、DNAアレイスキャナー (GenePix 4000B、Axon社製) を用いて、各スポットの蛍光量を測定した。測定データは、DNAアレイスキャナー付属の解析ソフトウェア (GenePix Pro 3.0) を用いて解析を行った。

【0065】

(実施例7) 固定プローブの密度検定

測定した蛍光量から各プローブの密度比を求めた。表7に示す。

【0066】

【表 7】

表 7

Ink No.	内容		濃度	密度比(%)
1	B-SH	1 色	1.5OD/ml	185
2	D-SH			189
3	F-SH			187
4	H-SH			189
5	B-SH	1 色	0.75OD/ml	100
6	D-SH			100
7	F-SH			98
8	H-SH			101
9	B-SH	1 色	0.5OD/ml each	67
10	D-SH			66
11	F-SH			66
12	H-SH			68
13	B-SH	1 色	0.375OD/ml each	51
14	D-SH			49
15	F-SH			51
16	H-SH			50

【0067】

密度比は、Ink No. 5におけるDNAプローブの固定密度を100%とした際、それに対する相対比として求めた。また、各外部標準核酸の標識率は、別途測定し、その標識率による補正を行った、密度比を示す。

【0068】

表7中、Ink No. 1～4の密度比（蛍光量）が、理論値の200%に満たないのは、プローブ核酸の固定量が、基板の許容量（飽和量）に達しているためである。

【0069】

また、表4中に示したInk No. 17～27の混合プローブにおける、各プローブの密度比は、それぞれ、対応する各プローブ濃度の単独プローブ密度比に準じた値を示した。

【0070】

（実施例8）外部標準核酸を用いた検量線の作成

実施例7の結果から、各プローブの固定量が検定され、この補正データを用い

て検量線を作成した。

【0071】

具体的には、実施例5で作製したDNAマイクロアレイを用いて、実施例6と同様にハイブリダイゼーション実験を行った。但し、外部標準核酸の添加量は、以下に示す混合量とした。

外部標準核酸の混合比

A-Rho: 66.7% (20 nM)

C-Rho: 25.0% (7.5 nM)

E-Rho: 6.7% (2.0 nM)

G-Rho: 1.7% (0.5 nM)

実施例6と同様の手順で、測定及び解析を行った。

【0072】

測定結果と、実施例7で求められたプローブ密度の補正值を用いて、検量線を作成した。図3に、作成された検量線を示す。

【0073】

(実施例9) PCR産物を用いた検量線の作成

実施例1で調製した内部標準用核酸、及び、実施例2で調製したと内部標準用プライマーを用いて、PCR増幅産物の検量線作成を行った。

【0074】

まず、表8の内部標準用プライマーの組み合わせを用いて、定法に従ってPCR増幅反応を行った。PCR反応液組成は、以下の通りである。なお、本実施例で使用した逆方向プライマーには、実施例3において準備した5'末端に蛍光標識を行ったものを使用した。

【0075】

PCR反応液

PCR プレミック反応液 (2×)	25 μ l	
pUC118 EcoR I Digest	1 μ l	
混合プライマー (表8)	6 μ l	
純水	18 μ l	／ トータル 50 μ l

温度サイクル

(92℃:10秒 62℃:15秒 72℃:30秒 24サイクル)

【0076】

【表8】

表8

No.	順方向プライマー	逆方向プライマー	プライマー濃度	増幅産物鎖長
1	P-4	PR-2*	5nmol/ml each	337bp
2		PR-3*		895bp
3	P-1	PR-4*		1776bp
4	P-2			758bp

*印は、蛍光標識付を示す。

【0077】

反応後、ゲルろ過を行い、PCR増幅産物を精製した。TE緩衝液を用いて容量調整した後、240nmの吸光度と蛍光量を測定して、核酸量と蛍光標識量を定量し、標識率を求めた。

【0078】

標識率を求めた内部標準増幅産物を用いて、実施例8と同様にハイブリダイゼーション反応を行い、プローブに結合した内部標準増幅産物に起因する蛍光量を測定した。

【0079】

測定結果から、内部標準増幅産物標識率と実施例7で求められたプローブ密度の補正值を用いて、検量線を作成した。図4に、作成された検量線を示す。

【0080】

図4に示す検量線を検討すると、増幅産物の分子量（鎖長）に依存して、検量線の傾きに差異がある。すなわち、目的の塩基配列を有す核酸の定量を、より高い確度で行うためには、目的の塩基配列を有する核酸の増幅産物と、同等の鎖長を有する内部標準増幅産物を与えるプライマー組み合わせを採用することが必要であると判断される。

【0081】

【発明の効果】

本発明にかかるDNAマイクロアレイでは、基板上に固定化されるプローブの固定化効率の検定作業を、DNAマイクロアレイ上に同時に作製される外部標準用プローブを利用して、検体試料中に添加する、既知濃度の標識率検定済み外部標準核酸を検出することで行い、一方、検出前に施される、核酸増幅、標識付加反応における、増幅倍率、標識効率の検定作業は、DNAマイクロアレイ上に同時に作製される内部標準用プローブを利用して、かかる核酸増幅、標識付加反応に同時に供される、既知濃度の内部標準核酸における増幅倍率、標識効率を測定することで行うことで、実際の目的とする核酸の検出操作と同時に、検定作業を簡便に実施することができる。また、その検定作業自体、同時に行う結果、高い精度の検定結果を得られる。そのため、本発明にかかるDNAマイクロアレイを利用することによって、目的とする核酸分子の定量分析における定量性精度は、著しく向上される。また、その定量分析操作では、本発明にかかるDNAマイクロアレイに対応させて、内部標準増幅用プライマー、外部標準核酸を検出用キットとして用いることで、利用者は非常に簡便に本発明を利用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の実施形態の一例を示し、内部標準用プローブ、外部標準用プローブ、外部標準核酸、ならびに、内部標準核酸の増幅用プライマーセット、その増幅産物を示す図である。

【図2】

本発明にかかるDNAマイクロアレイの一実施態様を模式的に示し、DNAマイクロアレイ中に具える内部標準用プローブの配置を示す図である。

【図3】

本発明にかかるDNAマイクロアレイを利用する定量分析において、DNAマイクロアレイ中に具える外部標準用プローブを利用する、プローブ固定化率を算定するための、検量線の作成例を示す図である。

【図4】

本発明にかかるDNAマイクロアレイを利用する定量分析において、DNAマイクロアレイ中に具える内部標準用プローブを利用する、PCR増幅倍率の算定

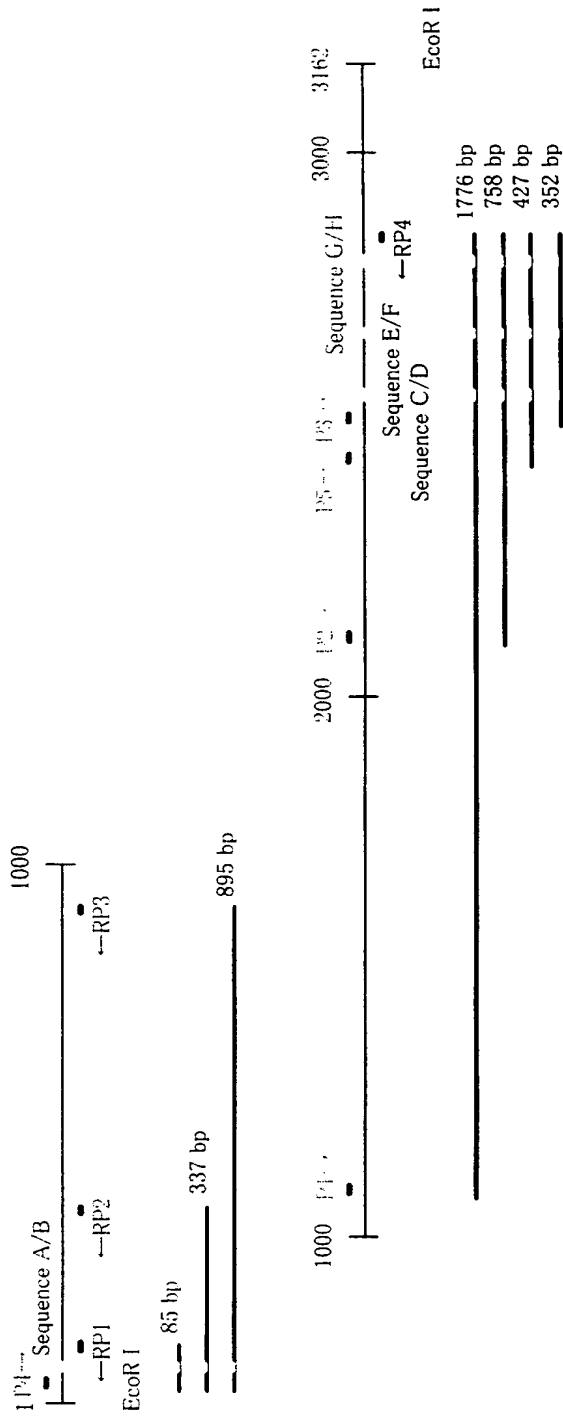
時における検量線と、増幅産物の核酸鎖長による検出感度の相違を示す図である

。

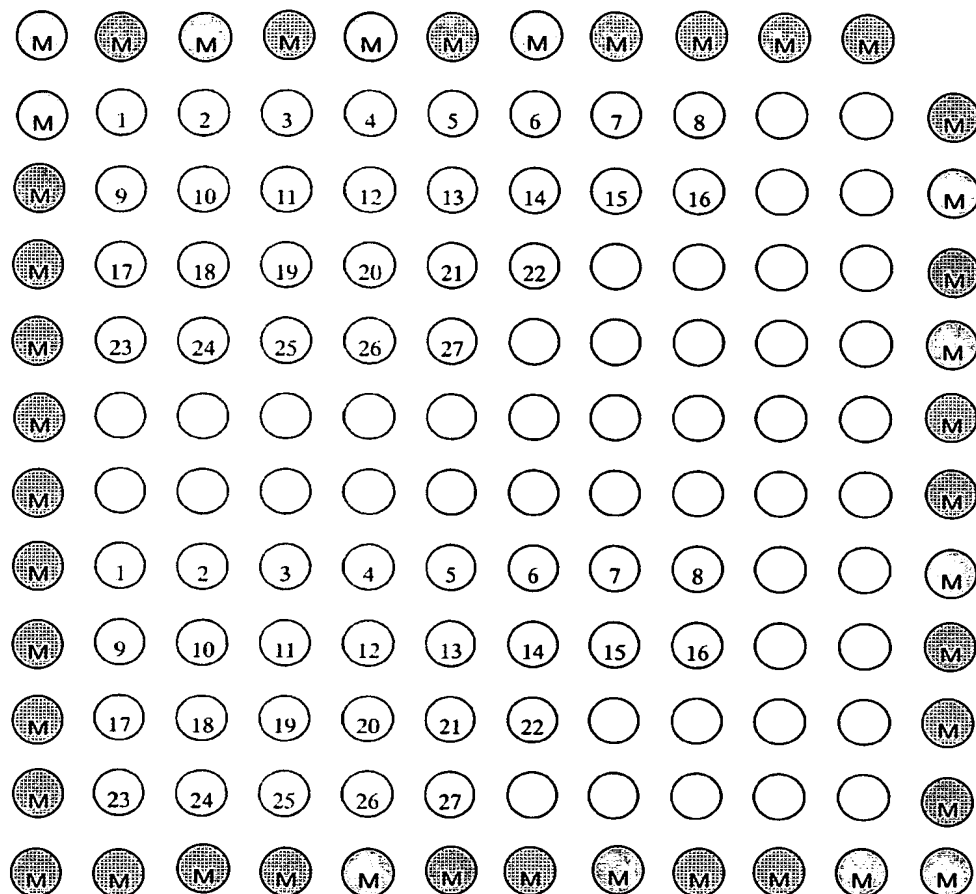
【書類名】

図面

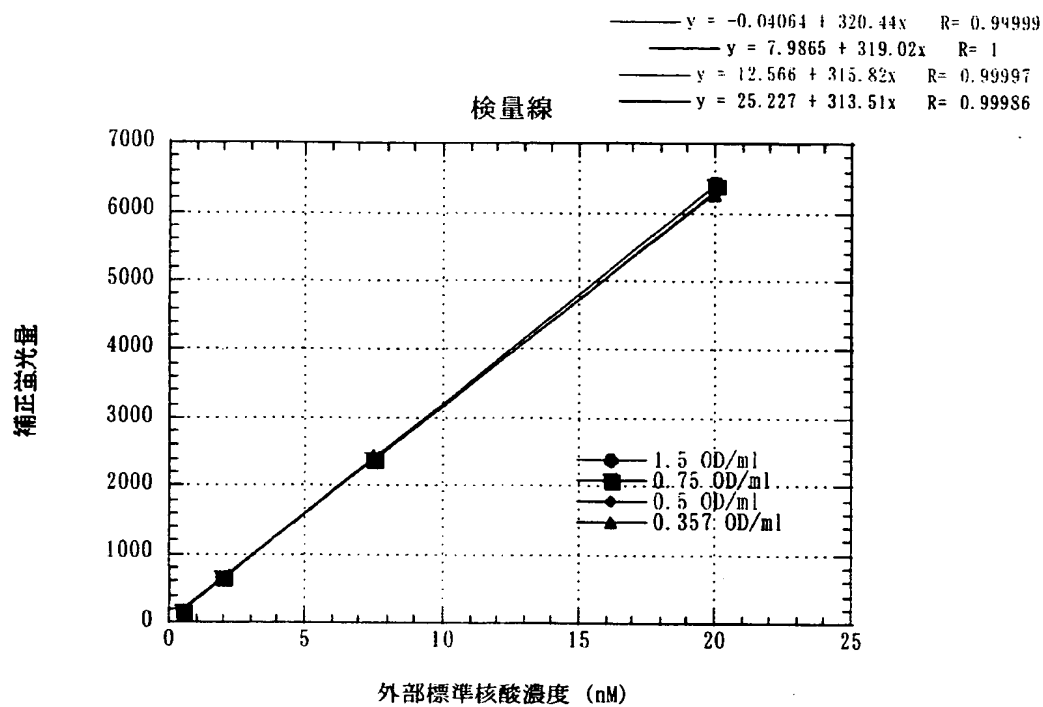
【図 1】



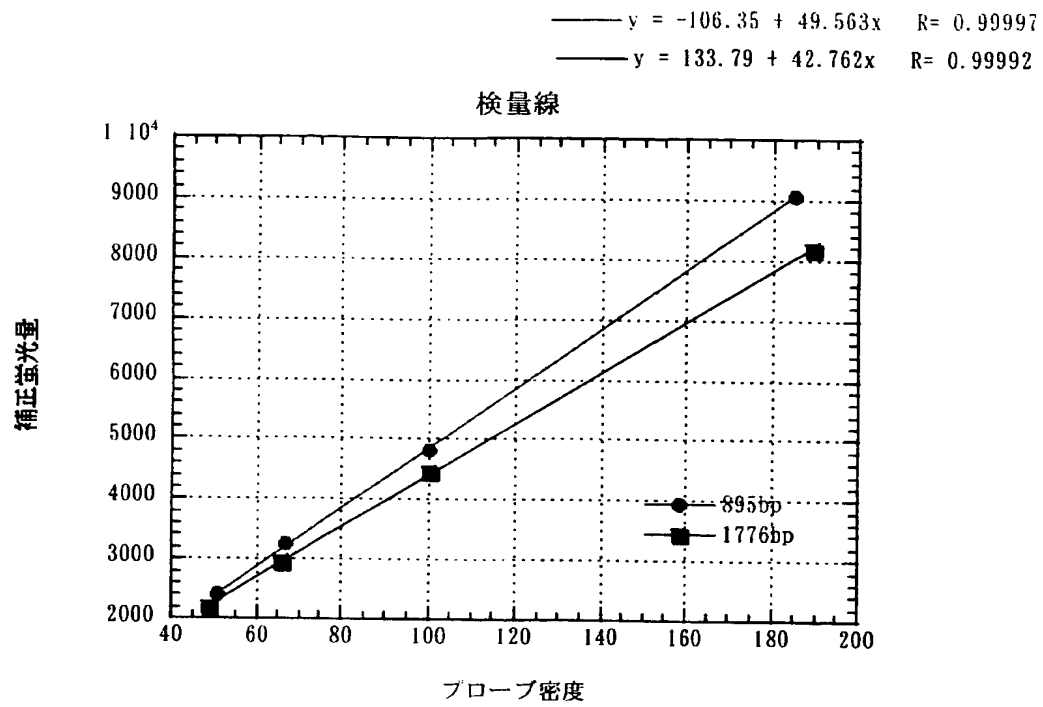
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DNAマイクロアレイを利用する定量分析に付随する、検定作業を著しく簡便化し、検体中に含まれる目的の塩基配列を有する核酸の定量、測定時に、その補正データを取得することが可能なDNAマイクロアレイと、その際に利用される検定用キットの提供。

【解決手段】 目的の塩基配列を有する核酸を検出する核酸プローブに加えて、検体に施される核酸増幅反応における増幅倍率の検定に利用される内部標準核酸の検出用の内部標準用プローブ一種以上、DNAマイクロアレイ上に固定されるプローブの固定化効率の検定に利用される外部標準核酸の検出用の外部標準用プローブ一種以上、これらの一種以上の検定用プローブを具えるDNAマイクロアレイとする。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 1 8 3 2 4 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 0 0 7]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号

氏 名

キャノン株式会社